

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk

Histologische und histochemische
Frühveränderungen bei der experimentellen
Erzeugung von Lebercarcinomen
durch Diäthylnitrosamin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Aram Dharamadhach *

aus Prachinburi (Thailand)

Marburg 1967

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

* Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk

Histologische und histochemische
Frühveränderungen bei der experimentellen
Erzeugung von Lebercarcinomen
durch Diäthylnitrosamin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Aram Dharamadhach *

aus Prachinburi (Thailand)

Marburg 1967

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

* Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 14. 7. 1967

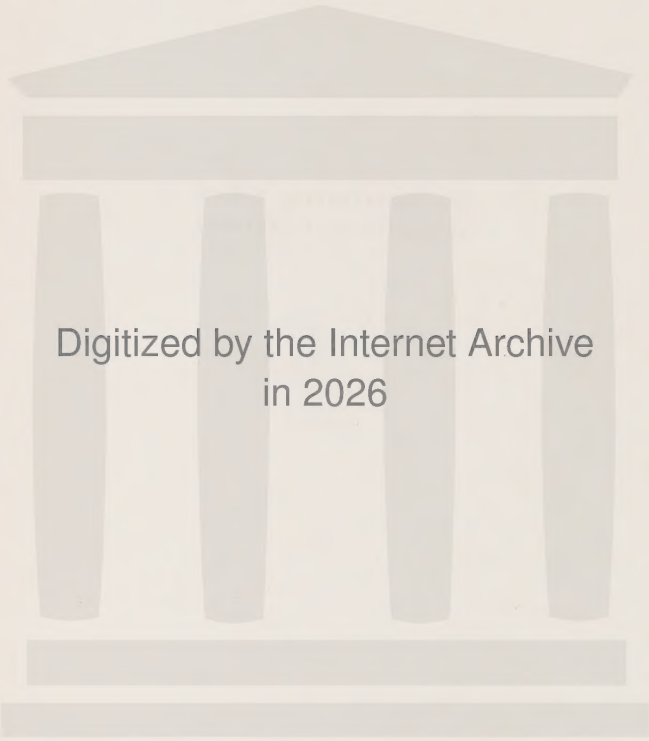
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Heuser

Referent: Prof. Dr. med. P. Gedigk

Correferent: Priv.-Doz. Dr. med. P. Schmitz-Moormann

Meinen geliebten Eltern
in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Versuchsordnung und Methoden</u>	4
<u>Ergebnisse</u>	6
<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	
Ablauf der Cancerisierung	15
Vergleich mit früheren Untersuchungen	17
Deutung der Befunde	22
Mesenchymale Reaktionen bei der Cancerisierung	24
<u>Zusammenfassung</u>	25
<u>Literatur</u>	28

E i n l e i t u n g

In der experimentellen Krebsforschung liegen zahlreiche Untersuchungen vor, die sich mit den histochemischen Veränderungen des Geschwulstgewebes befassen (Literatur bei Elizabeth und Miller 1952; Kaufmann 1958). Demgegenüber finden sich nur wenige Verlaufsuntersuchungen, welche die Veränderungen vor, während und nach der Tumorinduktion erfassen (Gössner und Friedrich-Freska 1964; Dunn 1965; Hadjiolov 1965).

Gerade solche Verlaufsuntersuchungen sind aber von besonderer Bedeutung, da sie Einblicke in Stoffwechselvorgänge und Stoffwechselumstellungen während der Carcinogenese gewähren und Hinweise auf die Angriffspunkte der carcinogenen Substanzen vermitteln.

Als besonders günstig für derartige Untersuchungen haben sich die Lebercarcinome erwiesen, da sich diese Krebse durch orale Zufuhr von Carcinogenen sicher erzeugen lassen. Während früher vorwiegend Buttergelb (p-Dimethylaminoazobenzol) als Carcinogen Verwendung fand, wurde es in den letzten Jahren zunehmend durch Dialkylnitrosamine, insbesondere Diäthylnitrosamin (DÄNA) verdrängt, weil sich dieses Carcinogen noch einfacher handhaben läßt (Magee und Barnes 1956; Schmähel, Preussmann und Hamperl 1960). Dabei hat sich als Versuchstier die Ratte, als Zufuhr die Verfütterung mit dem Trinkwasser besonders bewährt (Thomas und Schmähel 1960; Grundmann und Siegburg 1962).

Man nimmt an, daß diese Verbindungen im Gewebe, insbesondere aber in der Leber, enzymatisch zu instabilen Mono-Alkylnitrosaminen demethyliert werden und anschließend Diazoalkane entstehen. Diazoalkane sind infolge ihrer ausgeprägten alkylierenden Wirkung sehr stark carcinogen (Magee 1964). Bei hoher Dosierung sterben die Tiere sofort, oder es entstehen ausgedehnte zentrolobulär angeordnete Lebernekrosen sowie Lungen-

und Darmblutungen. Bei geringer Dosierung entwickeln sich nach einigen Wochen kleine Krebsknötchen in der Leber; außerdem entstehen in einem hohen Prozentsatz metastasierende Lebertumoren. Während bereits sehr kleine Mengen von Diäthylnitrosamin (1 : 2000 der Letaldosis) regelmäßig zur Bildung von Lebertumoren führen, muß Dimethylnitrosamin höher dosiert werden (Druckrey und Mitarb. 1963). Für bestimmte Carcinogene spezifische Leberveränderungen gibt es nicht.

Auch in anderen Organen können Tumoren auf diese Weise induziert werden. Die Lokalisation dieser Tumoren ist z. T. von der verwendeten Tierspezies und der Verabreichungsart der Carcinogene abhängig. Lebertumoren ließen sich bei Nagern, Fischen, Säugetieren und Primaten experimentell erzeugen (Thomas und Schmähel 1966).

Das Ziel der vorliegenden Experimente war es, durch enzymhistochemische Untersuchungen nähere Aufschlüsse über die Stoffwechselumstellung der Leberzelle während der Carcinogenese zu gewinnen. Weiterhin versuchten wir, Einblicke in die histochemisch darstellbare Enzymausstattung der verschiedenen Lebercarcinom-Typen zu erhalten.

Versuchsanordnung und Methodik:

Grundmann und Sieburg (1962) erarbeiteten an Ratten in einer Verlaufsuntersuchung die histo- und cytopathologischen Veränderungen bei der Cancerisierung mit Diäthylnitrosamin, Mölbert, Hill und Büchner (1962) die elektronenmikroskopischen Veränderungen. Um unsere Befunde mit diesen histologischen, cytologischen und elektronenoptischen Untersuchungsergebnissen korrelieren zu können, übernahmen wir die Versuchsanordnung dieser Autoren.

Tierversuche:

48 weibliche und 52 männliche Wistarratten * (etwa 8 Wochen alt, Anfangsgewicht 130 - 150 g) wurden in Gruppen von je 4 Tieren, getrennt nach dem Geschlecht, in Plastikkäfigen gehalten und erhielten Altromin-Futter ** ad libitum. An 76 Ratten wurde Diäthylnitrosamin (DÄNA)*** im Trinkwasser als 0,0075%ige Lösung verfüttert. Die mittlere Tagesdosis betrug - berechnet aus der durchschnittlichen Tagestrinkmenge einer Ratte (15 ml), - 1,125 mg pro Ratte (7,5 - 8,7 mg DÄNA pro kg Anfangskörpergewicht). 24 Ratten wurden für Kontrolluntersuchungen verwendet.

27 Tiere verendeten während der Verlaufsuntersuchung. Die übrigen Ratten wurden mit Abständen von 7 - 10 Tagen in Gruppen von je 3 Tieren zusammen mit einem Kontrolltier durch Dekapitierung getötet. Das Körper- und Lebergewicht wurden registriert und die Veränderungen in der Bauch- und Brusthöhle makroskopisch beurteilt. Innerhalb von 3 - 5 Minuten nach Tötung der Tiere wurde Gewebe von mehreren Stellen der Leber mit Kohlendäureschnee für die histochemischen Untersuchungen eingefroren. Außerdem wurde Lebergewebe in 4%igem, neutralem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und in üblicher Weise 3 - 5 μ dicke histologische Schnittpräparate angefertigt.

Untersuchungsmethoden:

An den Schnittpräparaten des fixierten Materials wurden folgende Färbungen durchgeführt: Hämatoxylin-Eosin, Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner und Silberimprägnation der Reti-

culumfasern nach Gomori. Die durchgeführten histochemischen Untersuchungen ergeben sich aus Tab. 1. Sie wurden an 10/ μ Kryostat-bzw. Gefriermikrotom-Schnitten durchgeführt.

Die histochemischen Nachweisverfahren für Enzyme sind vorwiegend qualitative Methoden, welche hauptsächlich dazu dienen, die Lokalisation der Enzymaktivität im Gewebe und in einzelnen Zellen zu ermitteln. Quantitativen Aussagen liegen in der Regel nur Schätzungen zugrunde. Auf eine Änderung der Fermentaktivität kann aber auch unter diesen Versuchsbedingungen geschlossen werden, wenn die betreffende Enzymaktivität stark zunimmt bzw. neu auftritt, oder wenn die Fermentreaktion sehr abgeschwächt wird, bzw. ganz verschwindet. Diese Voraussetzungen sind bei den vorliegenden Experimenten erfüllt.

Bei der vorliegenden Fragestellung sind die Veränderungen in den ersten Stadien der Carcinogenese, d. h. in den primären Carcinomzellen, von entscheidender Bedeutung. Da sich diese Zellen vereinzelt oder nur in sehr kleinen, mitunter erst mikroskopisch erkennbaren Gruppen inmitten gesunder, bzw. nur wenig geschädigter Zellen befinden, liegt es auf der Hand, daß sich ihre Stoffwechselumstellungen mit biochemischen Methoden in der Regel nicht sicher erfassen lassen, bei denen naturgemäß nur Durchschnittswerte an größeren Zellpopulationen ermittelt werden. Die Anwendung histochemischer Enzymnachweise in den ersten Stadien der Carcinogenese besitzt dementsprechend für diese Fragestellung eine besondere Bedeutung.

Zur Auswertung der histochemischen und enzymhistochemischen Reaktionen wurde die Stärke der Reaktionen am histologischen Schnitt unter dem Mikroskop abgeschätzt und je nach Stärke mit + bis ++++ bezeichnet. Bei den enzymhistochemischen Untersuchungen wurde stets ein Leberstück der Kontrolltiere mit inkubiert, so daß der Reaktionsausfall mit dem der normalen Leber verglichen werden konnte, der als Bezugswert gewählt und mit +++ angesetzt wurde.

Die 27 Tiere, welche im Versuchszeitraum verendeten, wurden ebenso untersucht, wie die getöteten Versuchstiere; lediglich unterblieben bei ihnen die enzym-histochemischen Untersuchungen.

-
- * Dr. E. Hagemann, Zuchtstation für Laboratoriumstiere, Bösingfeld, Lippe.
 - ** Altromin, standardisiertes Trockenfutter für Nagetiere, Altromin-G.m.b.H., Lage/Lippe.
 - *** Diäthylnitrosamin (DÄNA) wurde mir freundlicherweise von Herrn Doz. Dr. W. Kunz, Pharmakologisches Institut der Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

E r g e b n i s s e :

Nach Ablauf von zwei Monaten entwickelten sich bei den Versuchstieren eine Anorexie und ein Haarausfall. Gleichzeitig trat ein Gewichtsverlust auf, der bei den männlichen Tieren stärker ausgeprägt war und in den folgenden Monaten leicht zunahm. Lebercarcinome wurden erstmals 98 Tage nach Versuchsbeginn (mittlere DANA-Dosis 110,25 mg) beobachtet *) (Tab. 2). Nach 127 Tagen (mittlere DANA-Dosis 144 mg) und später wiesen alle Tiere Lebercarcinome auf. Demgegenüber konnten bei Kontrolltieren niemals Lebertumoren festgestellt werden.

26 Tiere verendeten spontan. Davon starben 11 Tiere vor dem 127. Tag. Diese Tiere waren krebsfrei. 4 von ihnen hatten eine Pneumonie. Die übrigen 7 Ratten waren lediglich stark abgemagert. - 15 Tiere verendeten nach dem 127. Tag. Sie wiesen sämtlich Lebercarcinome auf, 11 mit einer erheblichen Lebervergrößerung.

Bei einer Ratte entwickelte sich ein Katarakt. Einmal fand sich eine kleine Lungencyste, bei einer anderen eine kleine Nierenrindencyste. Bei einigen Tieren bestand vorübergehend eine unspezifische granulierende Entzündung des Ohrrandes. Mitunter wiesen die Tiere eine Hyperplasie der Nebennierenrinde auf.

Die während der Carcinogenese auftretenden cytologischen Veränderungen in der Leber lassen sich nach der verfütterten Gesamtdosis des Carcinogens in vier Phasen gliedern:

*) Bei einer weiblichen Ratte, die am 68. Tag nach der DANA-Gabe verendete, bestand ein Leiomyosarkom der Leber. Da es sich hier aber offenbar um einen Zufallsbefund handelt, soll auf diesen Tumor nicht näher eingegangen werden.

Erste Phase (bis 52 Tage, 58,5 mg DANA):

In dieser Periode war die Leber makroskopisch gewöhnlich unverändert und wies auch keine Gewichtszunahme auf. Nur bei einzelnen Tieren bestand eine leichte Blutstauung der Leber.

Mikroskopisch kam es in dieser Phase zu einer zunehmenden grobblasigen Umwandlung der Leberzellen. Diese Vakuolisierung trat zunächst in der Läppchenperipherie auf, war aber vom 14. Tag an nur in den zentralen Läppchenanteilen nachzuweisen. In den nächsten Wochen griff diese hydropische Schwellung auf die intermediären Läppchenabschnitte über und ließ sich am Ende dieser Phase bei ca. 50% der Leberparenchymzellen nachweisen. Gleichzeitig verstärkte sich in den zentralen Läppchenanteilen die Einwässerung und führte zu hochgradig blasig geschwollenen Zellen, deren Cytoplasma optisch leer war (Abb. 1 a). Solche "Klarzellherde" fanden sich erstmals am 25. Tag; bis zum Ende der Phase nahmen sie an Zahl deutlich zu. Die Kerne der grobblasig umgewandelten Zellen waren deutlich vergrößert und wiesen ein Ödem auf. In den ersten Wochen ließen sich nicht selten Einzelzellnekrosen nachweisen, und zwar am häufigsten um den 25. Tag in der Intermediärzone. Später wurden sie nur vereinzelt gefunden. Nach Ausbildung der Einzelzellnekrosen folgte kurze Zeit später eine Vermehrung der Leberzellmitosen.

Am Mesenchym der Leber fanden sich nur geringe Veränderungen. Um den 25. Tag sah man eine leichte Rundzellinfiltration der portalen Felder sowie eine Schwellung einzelner Sternzellen. Nach dem 25. Tag ließen sich läppchenzentral einzelne Ektasien der Sinusoide, hin und wieder mit einer geringen Endothelproliferation nachweisen.

Histochemisch ging der blasigen Schwellung ein RNS- und Glykogenschwund des Cytoplasmas parallel (Tab. 4). Dabei

waren die Klarzellherde weitgehend glykogen- und RNS-frei. Der DNS-Gehalt der blasig geschwollenen Kerne war leicht herabgesetzt. Die Enzymaktivität der lysosomalen, mikrosomalen und cytoplasmatischen - sowie etwas geringer der mitochondrialen - Enzyme war entsprechend der blasigen Schwellung vermindert und erreichte bei den Klarzellherden den tiefsten Wert (Tab. 5, Abb. 6a).

2. Phase (53. bis 86. Tag; 96,75 mg DÄNA):

Makroskopisch wies die Leber auch in dieser Phase keine Besonderheiten auf. Mikroskopisch wurde mit dem 53. Tag das Cytoplasma der grobblasigen Zellen im Läppchenzentrum zunehmend feinblasig umgewandelt, bis es schließlich weitgehend homogen erschien. Gleichzeitig stieg seine Anfärbbarkeit mit Eosin an. Diese eosinophilen Zellen nahmen während dieser Phase an Zahl ständig zu, ersetzten steigend die blasig geschwollenen Zellen und bildeten nicht selten herdförmige Ansammlungen (eosinophile Zellherde). Am Ende dieser Phase bestanden die Leberläppchen zu ca. 25% aus eosinophilen Zellen, zu 10% aus feinblasig und 40% aus grobblasig geschwollenen Zellen, während die restlichen 25% in ihrem mikroskopischen Bild den normalen Leberzellen entsprachen (Abb. 5). Die eosinophilen und die feinblasigen Zellen lagen im Läppchenzentrum, die grobblasig geschwollenen Zellen parazentral und in der Intermediärzone, die normalen Leberzellen in der Läppchenperipherie. Die Kerne der feinblasig geschwollenen und der eosinophilen Zellen entsprachen in ihrer Größe und Struktur denjenigen der grobblasigen Zellen (Abb. 1 b und c).

Histochemisch waren in den eosinophilen Zellen die DNS und RNS gegenüber der normalen Leberzelle deutlich vermehrt, der Glykogengehalt vermindert, jedoch höher als in den grobblasigen Zellen (Tab. 4). Die starke Eosino-

philie dieser Zellen machte zudem einen hohen Eiweißgehalt wahrscheinlich. Auch waren bei den eosinophilen Zellen, in geringerem Maße bei den feinblasigen Zellen, die Enzymaktivitäten wesentlich höher als bei den grobblasigen Zellen, erreichten aber nicht die Werte der normalen Leberzellen (Tab. 5, Abb. 6 b). Am Mesenchym der Leber traten während dieser Phase keine neuen Veränderungen auf.

Dritte Phase (87. bis 127. Tag; 144 mg DANA):

Makroskopisch fanden sich in dieser Phase vereinzelt kleine Cysten. Außerdem ließ sich bei zwei der 19 Tiere je ein knapp stecknadelkopfgroßer, grauweißer Knoten im Leberparenchym nachweisen.- Ein Tier wies eine postnekrotische Leberzirrhose auf.

Mikroskopisch trat in dieser Phase Läppchenzentral inmitten der grob- und feinblasigen sowie der eosinophilen Zellen ein neuer Zelltyp auf. Neben der Zentralvene ließen sich Gruppen von 3 - 12 Zellen nachweisen, die chromatinreiche Kerne enthielten und eine starke Basophilie des Cytoplasmas aufwiesen. Diese basophilen Zellen waren zumeist nur wenig größer als die normalen Leberzellen. Mitunter entsprachen sie aber auch in ihrer Größe den blasigen und den eosinophilen Zellen. Hin und wieder fanden sich nebeneinander kleine und große basophile Zellen. Die basophilen Zellen waren trabekulär angeordnet und lagen im Verband der Leberacini. Die Zahl dieser Zellgruppen nahm in dieser Phase ständig zu; am Ende dieser Periode fanden sie sich in jedem vierten bis zehnten Leberläppchen. Außerdem vergrößerten sich die Zellherde in dieser Zeit; sie nahmen aber nur selten mehr als ein halbes Leberläppchen ein. In den größeren Herden ließen sich mitunter an einzelnen Zellen eine Zellpolymorphie, eine Verschiebung der

Kernplasma-Relation zugunsten des Kerns, eine Kernhyperchromasie sowie Kernatypien nachweisen. Auch sah man hier nicht selten typische sowie atypische Mitosen (Abb. 2 a und b).

Histochemisch wiesen die Kerne der basophilen Zellen etwa den gleichen DNS-Gehalt auf wie die Kerne der eosinophilen Zellen. Der RNS-Gehalt des Cytoplasmas war stark erhöht, während das Glykogen weitgehend oder völlig geschwunden war (Tab. 4). Die Enzymaktivität der basophilen Zellen war hochgradig herabgesetzt und entsprach vielfach derjenigen der grobblasigen Zellen (Tab. 5, Abb. 6 c).

Die grobblasigen Zellen wurden auch in dieser Phase zunehmend durch feinblasige oder eosinophile Zellen ersetzt; am Ende dieser Versuchsperiode bestanden die Leberläppchen, wenn man die basophilen Zellen nicht berücksichtigte, zu 15% aus grobblasigen, zu 15% aus feinblasigen, zu 50% aus eosinophilen und zu 20% aus annähernd normalen Zellen (Abb. 5). Bei den makroskopisch beschriebenen Knötchen handelte es sich um hepatozelluläre Carcinome, deren weitere Charakterisierung weiter unten erfolgt.

Die makroskopisch gefundenen Hohlräume erwiesen sich als periportal gelegene biliäre Cysten, die von einem kubischen bis zylindrischen Epithel ausgekleidet wurden und in der Umgebung eine leichte Bindegewebsvermehrung aufwiesen. Histochemisch waren diese Epithelzellen fett- und glykogenfrei und enthielten nur wenig RNS im Cytoplasma. Enzymhistochemisch ließ sich lediglich bei den unspezifischen Esterasen eine geringe Aktivität nachweisen.

Vierte Phase (128. bis 190. Tag; 213,75 mg DÄNA):

Während dieser Phase bestanden bei allen untersuchten Tieren (35) Carcinome. Zu Beginn dieser Versuchsperiode wiesen die getöteten Tiere zumeist nur einzelne kleine Carcinomknoten auf. Später nahm die Zahl und Größe der Krebsknoten zu. Gegen Ende waren die Lebern von zahlreichen konfluierenden großen und kleinen Tumorknoten durchsetzt. Demgegenüber fanden sich bei den 10 verendeten Tieren, soweit sie nicht an einer Pneumonie eingegangen waren, schon zu Beginn der Periode zahlreiche große, konfluierende Tumorknoten (Abb. 3).

Das Lebergewicht war je nach der Tumorgesamtmasse gering oder deutlich vermehrt (Tab. 3). Alle Tiere wiesen einen haemorrhagischen Ascites auf. Bei 7 Tieren (20%) waren Metastasen aufgetreten, und zwar bei 5 Tieren in der Lunge, bei 1 Tier in den Lymphknoten an der Leberpforte und im großen Netz und bei 1 Tier sowohl in der Lunge als auch in den portalen Lymphknoten und im grossen Netz.

Mikroskopisch handelte es sich stets um hepatozelluläre Carcinome, während ein Cholangiocarcinom niemals gefunden wurde. In den Carcinomen war die Läppchenstruktur aufgehoben. Die Krebsknoten wuchsen verdrängend und infiltrierend gegen die Umgebung vor, schlossen aber nicht selten erhaltene portale Felder ein. Neben den makroskopisch erkennbaren Krebsknoten fanden sich vor allem in der Mitte und am Ende dieser Versuchsperiode häufig Mikrocarcinome, sowohl in der Nachbarschaft der makroskopisch sichtbaren Krebsknoten als auch in den makroskopisch krebsfreien Leberanteilen. Die Mikrocarcinome ähnelten in ihrem Zellbild den bereits weiter oben beschriebenen basophilen Zellherden und bestanden zumeist aus großen basophilen Zellen. Diese Zellen wiesen aber erhebliche Kernatypien auf und zeigten vermehrt typische so-

wie atypische Mitosen; auch war in ihrem Bereich die Läppchenstruktur aufgehoben (Abb. 2 c). Mitunter schlossen sich solche Mikrocarcinome zu größeren Krebsknoten zusammen.

Bei den makroskopisch sichtbaren Carcinomen ähnelten die Zellen mehr den eosinophilen als den basophilen Zellen, da sie einen breiten Zelleib mit einem gleichmäßig strukturierten, fast homogenen Cytoplasma aufwiesen. Jedoch war in diesen Zellen der RNS-Gehalt wesentlich größer, so daß sich das Cytoplasma bei der HE-Färbung nicht rot, sondern rot-violett färbte.

In ihrer Wachstumsform entsprachen die Lebercarcinome bei 5 Tieren dem trabekulären Typ (Kettler 1958). Einen rein tubulo-alveolären Typ (Kettler 1958) konnten wir niemals beobachten. Jedoch fanden wir bei 24 Tieren (69%) ein teils trabekuläres, teils tubulo-alveoläres Carcinom. Bei 6 Tieren (17%) sahen wir ein anaplastisches Leberzellcarcinom, wobei dreimal gleichzeitig trabekuläre und einmal trabekulär-tubulo-alveoläre Strukturen nachweisbar waren.

In den tubulo-alveolären Abschnitten der Leberzellcarcinome (Abb. 4a) bestand nur eine geringe Zellpolymorphie. Außerdem fanden sich nur wenige typische oder atypische Mitosen. Glykogen ließ sich nicht nachweisen. In den Tubuli und den Alveolen stellte sich jedoch mitunter ein PAS-positives, diastaseresistentes Material dar, dem offenbar ein Glycoproteid oder ein neutrales Mucopolysaccharid zugrundelag. Hin und wieder waren die Tumorzellen feintropfig verfettet. Der DNS-Gehalt war leicht, der RNS-Gehalt stark erhöht (Tab. 4). Die Aktivität der untersuchten Enzyme war häufig nur gering herabgesetzt; bei

den mitochondrialen Enzymen entsprach sie mitunter sogar derjenigen des normalen Lebergewebes (Tab. 6, Abb. 7 a).

Beim trabekulären Leberzellcarcinom bestand eine deutliche Zell- und Kernpolymorphie; auch ließen sich reichlich typische sowie atypische Mitosen nachweisen (Abb. 4 b). Bei der histochemischen Untersuchung waren die Carcinomzellen im allgemeinen glykogenfrei. Mitunter wiesen sie eine geringe feintropfige Verfettung auf. Der DNS-Gehalt war leicht, der RNS-Gehalt hochgradig vermehrt (Tab. 4). Enzym-histochemisch war die Aktivität aller untersuchten Enzyme deutlich abgeschwächt; am stärksten bei der Esterase, der Cytochromoxydase, der Monoaminoxidase und der Glucose-6-phosphatase (Tab. 6, Abb. 7b).

Bei dem anaplastischen Carcinom waren die Kern- und Zellpolymorphien sehr ausgeprägt; auch sah man häufig Riesenkerne (Abb. 4 c). Glykogen und Fett fehlten, während die DNS leicht und die RNS erheblich vermehrt waren (Tab. 4). Die Aktivität der untersuchten Enzyme war bei diesem Tumortyp am stärksten abgeschwächt (Tab. 6, Abb. 7 c).

Die Metastasen wiesen sämtlich ein trabekuläres Wachstum auf, obwohl nur bei vier Fällen das Lebercarcinom diese Wachstumsform zeigte. Bei den übrigen drei Fällen wuchs der Primärtumor trabekulär-tubulo-alveolär.

Am Leberparenchym ließ sich auch in dieser Phase ein zunehmender Schwund der grobblasigen Zellen feststellen, während die eosinophilen Zellen ebenso wie die normalen Leberzellen zunahmen. Gegen Ende dieser Periode bestanden im erhaltenen Leberparenchym die Acini zu etwa 5%

aus feinblasigen, zu 45% aus eosinophilen und zu 45% aus normalen Zellen, während sich nur noch 5% grob- und mittelblasige Zellen fanden (Abb. 5).

Die basophilen Zellherde nahmen nur zu Beginn dieses Versuchsabschnittes noch an Zahl zu. Später fiel ihre Zahl ab und nach dem 157. Tag fehlten sie völlig. Gleichzeitig ließ sich in diesen Herden eine Zunahme der großen basophilen Zellen auf Kosten der kleinen feststellen. Zudem nahmen die basophilen Zellherde an Größe zu, wiesen in steigendem Maße Zell- und Kernunregelmäßigkeiten sowie einen Verlust der Läppchenstruktur auf und zeigten fließende Übergänge zu den Mikrocarcinomen.

Biliäre Cysten, wie sie in der vorigen Phase vereinzelt gefunden wurden, ließen sich jetzt häufiger nachweisen. Zudem sahen wir bei 6 Tieren Gallengangswucherungen, die in einem dichten, fibrotischen Gewebe lagen, also eine Cholangiofibrose. Die gewucherten Gallengänge waren gewöhnlich erweitert, enthielten ein acidophiles Material sowie einen Zelldetritus und waren von einem ein- und zweischichtigen proliferierenden Epithel ausgekleidet. Die Kerne der Epithelzellen waren chromatinreich und rund oder oval gestaltet; ihr Cytoplasma war gering oder stark acidophil. Histochemisch waren diese Epithelzellen glykogenfrei; sie zeigten einen vermehrten RNS-Gehalt sowie eine verminderte Aktivität der Dehydrogenasen, der Diaphorasen und der mikrosomalen Enzyme. In den fibrotischen Bereichen fielen sowohl in Zellen als auch extrazellulär die histochemischen Reaktionen negativ aus.

Besprechung der Ergebnisse:

I. Ablauf der Cancerisierung:

1. Phase:

Bei unserer Verlaufsuntersuchung sahen wir in den ersten Tagen eine läppchenperiphere Schwellung der Leberzellen. Am 14. Tag (15,75 mg DÄNA) ließ sich in den läppchenzentralen Leberabschnitten eine grobblasige Umwandlung der Leberzellen feststellen, die bis zum 52. Tag (58,5 mg DÄNA) an Intensität und Ausdehnung ständig zunahm. In den grobblasigen Zellen kam es zu einem fortschreitenden Schwund des RNS und des Glykogens. Außerdem trat eine zunehmende Verminderung der Aktivität aller untersuchten Enzyme auf, die dann bei den hochgradig geschwollenen Zellen, den "klaren Zellen", den tiefsten Wert erreichte. Dabei schwand vor allem die Aktivität der lysosomalen, der mikrosomalen und der cytoplasmatischen Enzyme, während der Aktivitätsabfall der mitochondrialen Enzyme weniger ausgeprägt war.

2. Phase:

Mit dem 52. Tag begann läppchenzentral eine feinblasige Umwandlung der Leberzellen mit Zunahme ihrer Eosinophilie, bis die Zellen schließlich fast homogen und stark eosinophil erschienen. Synchron kam es im Cytoplasma der eosinophilen Zellen zu einem erheblichen Anstieg des Eiweiß-, RNS- und des Glykogengehaltes und im Kern zu einer Vermehrung des DNS. Auch die Aktivität der lysosomalen, mitochondrialen, mikrosomalen und cytoplasmatischen Enzyme nahm mit der Eosinophilie der Zellen zu; sie lag aber noch deutlich niedriger als bei den normalen Leberzellen.

3. Phase (Beginn des Carcinoms):

Vom 87. Tag (96,75 mg DÄNA) an tauchten läppchen-zentral kleine Gruppen klein- und großkerniger, stark basophiler Zellen auf. In der Folgezeit nahm die Zahl und Größe dieser basophilen Zellherde zu; sie bestanden schließlich vorwiegend aus großen basophilen Zellen, wiesen Kernatypien auf und konnten von Mikrocarcinomen nicht immer sicher abgegrenzt werden. Zudem traten in dieser Phase bereits vereinzelt makroskopisch nachweisbare Carcinome auf. In den basophilen Zellen war der DNS-Gehalt des Kernes und der RNS-Gehalt des Cytoplasmas gegenüber den eosinophilen Zellen nicht verändert; jedoch entsprach die mangelnde Eosinophilie der basophilen Zellen einem Schwund an cytoplasmatischem Eiweiß. Auch der Glykogengehalt des Cytoplasmas war herabgesetzt. Die Enzymaktivitäten waren in den basophilen Zellen hochgradig vermindert.

Mit der Vergrößerung dieser Zellherde trat keine weitere nachweisbare Änderung des histochemischen Verhaltens dieser Zellen ein, auch wenn es zur Ausbildung der morphologisch faßbaren Kriterien einer carcinomatösen Umwandlung kam, wie Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kernes, Zellpolymorphie, Kernhyperchromasie, Kernatypien, erhöhte Mitoserate mit typischen und atypischen Zellteilungsfiguren sowie einem expansiven und infiltrierenden Wachstum.

4. Phase (Entwicklung makroskopisch nachweisbarer Carcinome:

Vom 128. Tag an (144 mg DÄNA) fanden sich bei allen Tieren bereits makroskopisch erkennbare Carcinome. Daneben ließen sich auch Mikrocarcinome nachweisen. Die Zahl der basophilen Zellherde nahm in der Folgezeit zunehmend ab, die Zahl der Mikro- und Makrocarcinome entsprechend zu. Dabei kam es zur Ausbildung von

drei Carcinomtypen, nämlich trabekulo-tubulo-alveolären, trabekulären und anaplastischen Carcinomen, die sich auch in ihrem histochemischen Verhalten unterschieden: Die tubulo-alveolären Abschnitte der Carcinome waren gut differenziert, wiesen eine geringe Zellpolymorphie sowie eine niedrige Mitoserate auf. Die Aktivität der untersuchten Enzyme war in ihnen nur wenig herabgesetzt und erreichte mitunter sogar diejenige der normalen Leberzellen. Bei dem trabekulären Carcinom waren die Zelltypen und die Mitoserate schon größer; dementsprechend waren auch die Enzymaktivitäten stärker herabgesetzt. Am ausgeprägtesten waren die Atypien und die Mitosesteigerung bei dem anaplastischen Carcinom. Dem entsprach eine hochgradige Herabsetzung der Enzymaktivitäten, die allerdings nicht so niedrige Werte wie in den basophilen Zellherden und den Mikrocarcinomen erreichten.

II. Vergleich mit früheren Versuchen:

Die Cancerisierung erfolgte bei uns in der gleichen Weise wie sie von Grundmann und Siegburg (1962) beschrieben wurde.

Diese Autoren sahen bis zum 45. Fütterungstag (37,50 mg DANA) eine läppchenperiphere, grobblasige Schwellung der Leberzellen, die bis zum 75. Tag (59,2 mg DANA) durch eine läppchenzentrale, grobblasige Schwellung ersetzt wurde. Bis zum 97. Tag (75,75 mg DANA) wurde das Cytoplasma dieser Zellen zunehmend feinblasig umgewandelt. In der folgenden Phase bis zum 142. Tag (109,50 mg DANA) traten läppchenzentral Krebszellen in Form kleiner Nester stark basophiler kleiner Zellen auf. Diese Zellherde wurden rasch größer, wiesen zunehmend Kern- und Zellatypien auf und schlossen sich zu größeren Krebsherden zusammen, so daß bei Beendigung der Versuchsreihe (202 Tage = 154,50 mg DANA) alle Tiere grobknotige Lebercarcinome enthielten.

Demgegenüber trat die Cancerisierung bei uns früher auf als bei Grundmann, jedoch erst bei einer höheren Gesamtdosis. Damit wird die Feststellung Druckreys und

Mitarb. (1963) bestätigt, daß die Krebsentstehung bei DANA-Fütterung dosis- und zeitabhängig ist und als "beschleunigter" Vorgang nach Art einer Verstärkerwirkung verläuft. Dementsprechend sind auch die einzelnen Phasen der Krebsentstehung bei unserer Untersuchung verkürzt. Abweichend von Grundmann sahen wir nur eine flüchtige läppchenperiphere Zellschwellung zu Beginn der DANA-Fütterung. Wir möchten diese Abweichung auf Dosierungsunterschiede zurückführen. Während wir in der ganzen Untersuchungsperiode täglich 1,125 mg DANA pro Tier verfütterten, gab Grundmann in den ersten drei Tagen 1,5 mg, später nur 0,75 mg DANA pro Tier. Es wäre denkbar, daß die anfängliche hohe Dosierung bei diesen Versuchen zu einer läppchenperipheren toxischen Leberzellschädigung geführt hat. Dafür würde auch sprechen, daß Grundmann in dieser Phase läppchenperipher nicht selten Zellnekrosen sah, während wir solche Nekrosen immer nur läppchenzentral beobachten konnten. Weiterhin war bei uns die feinblasige Umwandlung der Leberzellen ausgeprägter als bei Grundmann und führte zur Ausbildung fast homogener eosinophiler Zellen. Schließlich traten bei uns während der carcinomatösen Umwandlung der Leberzellen von Anfang an nicht nur kleine, sondern auch große basophile Zellen auf, vereinzelt sogar kleine Carcinome. Im weiteren Verlauf verschwanden die kleinen basophilen Zellen völlig. Wir möchten diese Unterschiede auf unsere höhere Dosierung zurückführen, welche die krebsige Umwandlung der Zellen sowie die Ausbildung von Mikro- und Makrocarcinomen beschleunigte und damit zur Überlappung zwischen den bei Grundmann gut abgegrenzten Phasen führte.

Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den Experimenten von Grundmann und unseren Beobachtungen aber so geringfügig, daß ein Vergleich unserer histochemischen Untersuchungen mit den cytologischen Ergebnissen Grundmanns (Grundmann und Siegburg 1962) und den elektronenmikroskopischen Befunden von Mölbert, Hill und Büchner (1962) ohne weiteres möglich ist:

Die grobblasige Schwellung (1. Phase) ist Ausdruck einer Energiestoffwechselstörung der Zelle und kann durch die verschiedensten Noxen verursacht werden (Altman 1955, 1957; Büchner 1957, 1966). Elektronenmikroskopisch erweist sich die grobblasige Degeneration bei DANA-gefütterten Ratten als eine blasige Durchtränkung des Grundplasmas mit Auseinanderweichen der Lamellen

des endoplasmatischen Reticulums und Schwund des Ribosomenbesatzes (Mölbart, Hill und Büchner 1962) und entspricht also dem submikroskopischen Bild der grobblasigen Schwellung schlechthin (Mölbart 1957; Hübner und Bernhardt 1961). Die Struktur der Mitochondrien wird während der grobblasigen Schwellung nicht verändert; jedoch variiert ihre Form stärker als es der Norm entspricht (Mölbart, Hill und Büchner 1962).

Die von uns festgestellten histochemischen Zellveränderungen unterstreichen die "energetische Insuffizienz" der hydropisch geschwollenen Zelle. Die geringere Störung der mitochondrialen Enzymaktivitäten korreliert gut mit dem submikroskopischen Befund, daß die Mitochondrien kaum geschädigt sind. Nickels und Dieners (1965) konnten an isolierten Rattenlebermitochondrien keine Herabsetzung der oxydativen Phosphorylierung während der Cancerisierung mit DÄNA feststellen. Man muß also annehmen, daß die Herabsetzung der histochemisch faßbaren mitochondrialen Enzymaktivitäten nicht auf einer direkten Schädigung der Mitochondrien beruht, sondern eher durch Veränderungen im umgebenden Ergastoplasma und Cytoplasma bedingt sind.

In der Regel folgt der blasigen Einwässerung des Cytoplasmas bald die totale Cytolyse (Altmann 1955). Bei der DÄNA-Cancerisierung bleibt dieser Zelluntergang aus. Vielmehr tritt hier eine feinblasige eosinophile Umwandlung des Cytoplasmas mit Vermehrung des Eiweißes auf (Grundmann und Siegburg 1962), die sich elektronenmikroskopisch als eine feinvakuoläre Umwandlung des endoplasmatischen Reticulums erweist (Mölbart, Hill und Büchner 1962) (Phase 2).

Büchner und Mitarbeiter sehen in dieser feinvakuolären Umwandlung eine Art Kompensation der primären Zellverwässerung, die auch bei unserer Versuchsreihe weitgehend erreicht wurde, zumal der Eiweiß- und RNS-Gehalt der Zellen wieder erhöht, die Kernleistung also gesteigert war (Grundmann und Siegburg 1962).

Wie unsere Untersuchungen zeigen, wurde auch die enzymatische Stoffwechsellage in dieser Versuchsperiode gebessert. Einmal kam es zu einer deutlichen Erhöhung aller Enzymaktivitäten, wenn auch nicht die Werte der Normalzelle erreicht wurden. Weiterhin ließ sich in den Zellen deutlich Glykogen nachweisen, - sie waren also wieder zur Glykogenese befähigt.

Unsere Untersuchungen bestätigen also die Ansicht Büchners, daß im Stadium der feinblasigen Umwandlung eine weitgehende Kompensation der durch das Carcinogen verursachten Zellschädigung erreicht wird.

Aus den feinblasigen Zellen entstehen durch wiederholte amitotische Kern- und Zelldurchschnürungen läppchenzentral kleine basophile Zellen (3. Phase, Beginn der Carcinome). Diese Zellen weisen elektronenmikroskopisch einen Reichtum an parallel liegenden Ergastoplasmalamellen auf, die dicht mit Ribosomen besetzt sind, gleichen im übrigen aber in ihrer Ultrastruktur normalen Leberzellen (Mölbart, Hill und Büchner 1962). Mit der Vergrößerung dieser Zellherde steigt die Mitoserate sprunghaft von 2 auf 8-16% an (Grundmann und Siegburg 1962). Diese gesteigerte amitotische und mitotische Zellvermehrung führt zu einer erheblichen Verkürzung der Wachstums- und Differenzierungszeit und verhindert damit trotz der weitgehenden Ausbildung der Cytoplasmastrukturen die eigentlichen zellspezifischen Leistungen (Oehlert, Coté und Büchner 1961).

Auch unsere histochemischen Befunde sprechen für eine solche Hemmung der zellspezifischen Differenzierung, sahen wir doch eine extreme Verminderung aller untersuchten Enzymaktivitäten sowie einen völligen Glykogenschwund. Demgegenüber waren als Ausdruck der gesteigerten Kernleistung die DNS und RNS erheblich vermehrt.

In der folgenden Zeit (4. Phase) entwickeln sich makroskopisch sichtbare Carcinome, bei denen sich histologisch drei Typen unterscheiden lassen: Das tubulo-alveoläre, das trabekuläre und das anaplastische Leberzellcarcinom. Diese drei Carcinomtypen kamen vielfach nebeneinander in derselben Leber vor.

Zu dem enzymhistochemischen Verhalten experimentell erzeugter Lebercarcinome liegen im Schrifttum widersprüchliche Befunde vor (Literatur bei Wachstein 1962). Zumeist wurde bei den verschiedenen lysosomalen, mitochondrialen, mikrosomalen und cytoplasmatischen Enzymen eine Herabsetzung der Aktivität gefunden.

Bei unserer Verlaufsuntersuchung wies das tubulo-alveoläre Carcinom, das auch histologisch gut differenziert war, histochemisch nur eine geringe Herabsetzung der Enzymaktivitäten auf. Beim trabekulären Carcinom waren entsprechend der geringeren morphologischen Differenzierung auch die Enzymaktivitäten herabgesetzt. Bei dem anaplastischen Carcinom schließlich waren die Enzymaktivitäten am stärksten vermindert.

Da diese Entwicklungsphase der Carcinogenese von Grundmann und Siegburg (1962) nicht näher untersucht wurde, können unsere Beobachtungen mit diesen älteren Versuchen nicht verglichen werden.

III. Deutung der Befunde

Büchner hat aufgrund der Beobachtungen seiner Schule und der Untersuchungen anderer Autoren folgende Hypothese der Cancerisierung aufgestellt: "Unter physiologischen Bedingungen steuern die organ- und parenchym-spezifischen Ribonucleinsäuren und Proteine die DNS-Synthese im Sinne eines Reglermechanismus. Sind sie in genügender Konzentration vorhanden, so hemmen sie die weitere Synthese der DNS. Fehlen sie dagegen, - reversibel nach partieller Hepatektomie, irreversibel nach genügender Einwirkung von Cancerogenen, - so wird an den Chromosomen der betroffenen Zellen die DNS-Verdoppelung angeregt: Auf diese Weise kommt bald eine endomitotische Polyploidisierung oder eine mitotische Zellteilung zustande. Der bei den Cancerogenen irreversible Verlust an spezifischen RNS und Proteinen bewirkt durch das Versagen des Reglers eine hemmungslose Zellvermehrung und dadurch das invasive carcinomatöse Wachstum" (Oehlert, Coté und Büchner 1961).

Auch bei der DÄNA-Cancerisierung führt die carcinogene Noxe zu einer Zerstörung von zellspezifischen Strukturproteinen und damit zu einer Leistungssteigerung des Kerns mit erhöhter RNS-Produktion. Der Kern erreicht diese Leistungssteigerung durch eine endomitotische Vervielfachung des Chromosomensatzes, die es ihm ermöglicht, die cytoplasmatischen Funktionen zunächst wieder herzustellen (Umwandlung der grobblasigen Schwellung in eine feinblasige Schwellung). Bei weiterer Einwirkung des Carcinogens kommt es zu einer Ploidiereduktion, wobei die intrazellulären Regulationen versagen und das ungehemmte maligne Wachstum einsetzt (Grundmann und Siegburg 1962).

Unsere histochemischen und enzymhistochemischen Befunde ergänzen und erweitern also die histologische und cytologische Untersuchung von Grundmann und Siegburg (1962) sowie die elektronenmikroskopischen Beobachtungen von Mölbert, Hill und Büchner (1961) bei der Carcinogenese: Dem Stadium der Cytoplasmaschädigung entspricht ein zunehmender Schwund des Glykogens und der Enzymaktivitäten. Die vorübergehende Kompensation der Cytoplasmaschädigung drückt sich histochemisch in einer Glykogen-Einlagerung, enzymhistochemisch in einem Anstieg aller Enzymaktivitäten aus. Während der Cancerisierung der Leberzelle ist infolge der gesteigerten Mitoserate eine Bildung zellspezifischer Proteine nicht mehr möglich. Dem entsprechen histochemisch ein Glykogenschwund und eine extreme Herabsetzung aller Enzymaktivitäten. Wir sehen also in unseren Untersuchungsergebnissen eine weitere Stütze für die Büchner'sche Hypothese der Cancerisierung.

Darüber hinaus machen unsere Untersuchungen aber deutlich, daß die Störung der intrazellulären Regulation bei und nach der Cancerisierung der Leberzellen nicht unbedingt vollständig ist. So sahen wir an den voll ausgebildeten Carcinomen gegenüber den primären Carcinomzellnestern und den Mikrocarcinomen mitunter wieder eine Zunahme der Zelldifferenzierung und der Enzymaktivitäten. Bei den anaplastischen Carcinomen war diese Zunahme gering, bei den tubulo-alveolären Carcinomen aber so erheblich, daß hier u.U. die Enzymaktivität der normalen Leberzelle erreicht wurde.

Somit ist also anzunehmen, daß sich die intrazelluläre Regulation nach der Cancerisierung auf einem neuen, je nach Carcinomtyp unterschiedlich tiefen Niveau mit einem entsprechenden Verlust der zellspezifischen Eigenschaften einspielt. Dabei ist es interessant, daß wir

vielfach nebeneinander tubulo-alveoläre und trabekuläre, tubulo-alveoläre und anaplastische sowie trabekuläre tubulo-alveoläre und anaplastische Carcinome nachweisen konnten. Offenbar führt die Cancerisierung in den multiloculär entstehenden Carcinomen zu einer unterschiedlich weitgehenden Entkoppelung der interzellulären Regulationen und damit zu einer unterschiedlichen Entdifferenzierung der Carcinome.

IV. Mesenchymale Reaktionen bei der Cancerisierung.

Wie schon Grundmann und Siegburg (1962) sahen wir nur geringfügige Veränderungen des Lebermesenchyms. Erst in der Carcinomphase traten gehäuft biliäre Cysten und Gallengangswucherungen auf. Eine Lebercirrhose konnten wir nur einmal beobachten. Demgegenüber beschreiben die Voruntersucher stets ausgeprägte Gallengangswucherungen und Fibrosen, die in eine Cirrhose überleiten (Schmährl, Preussmann, Hamperl 1960; Thomas 1961). Grundmann macht darauf aufmerksam, daß Lebercirrhose und Lebercarcinom zwar ihren gemeinsamen Ursprung in einer Schädigung des Leberparenchyms haben, aber auf zwei verschiedenen Wegen entstehen: Die Cirrhose als Reaktion auf Zellnekrosen, das Carcinom durch eine für die Zelle subletale Störung mit schließlicher Entkoppelung der intrazellulären Regulationen. Dem entspricht, daß hohe Nitrosamingaben zu schweren, vorwiegend läppchenzentralen, tödlichen Lebernekrosen führen (Barnes und Magee 1954; Schmährl, Preussmann und Hamperl 1960). Mittlere Dosen bedingen ebenfalls erhebliche Zelluntergänge in den Leberläppchen, werden aber in der Regel überlebt und führen zu einer ausgedehnten Bindegewebsvermehrung und zur Cirrhose (Magee und Barnes 1956). Noch geringere Dosen führen nur zu relativ wenigen Einzelzellnekrosen, die phagocytiert und durch eine mitotische Zellneubildung ersetzt werden, so daß keine Faservermehrung, jedoch eine Cancerisierung der Leberzelle eintritt (Grundmann und Siegburg 1962).

Z u s a m m e n f a s s u n g :

1. Zum Studium der histochemischen Veränderungen der Leberzelle während der Krebsentwicklung erhielten 76 Ratten täglich 1,125 mg DÄNA im Trinkwasser. Die Tiere wurden in Gruppen zu dreien zusammen mit je einem unbehandelten Kontrolltier in verschiedenen Abständen vom Versuchsbeginn getötet und ihre Lebern histologisch und histochemisch untersucht.
2. In der ersten Phase (bis zu 52 Tagen = 58,5 mg DÄNA) wiesen die Leberzellen läppchenzentral eine Kernvergrößerung und eine grobblasige Schwellung auf. Histochemisch waren entsprechend dem Grad der blasigen Umwandlung die DNS, RNS und das Glykogen vermindert; außerdem war die Aktivität der lysosomalen, mikrosomalen und cytoplasmatischen Enzyme hochgradig herabgesetzt, während die mitochondrialen Enzyme weniger abgeschwächt waren.
3. In der zweiten Phase (bis zum 86. Tag = 96,75 mg DÄNA) waren die Kerne unverändert vergrößert; jedoch wurde das Cytoplasma feinblasig umgewandelt und schließlich nahezu homogenisiert. Histologisch bestand eine Vermehrung der DNS sowie der RNS und des Eiweißes des Cytoplasmas. Auch enthielten die Zellen wieder vermehrt Glykogen. Enzymhistochemisch war die Aktivität der untersuchten Enzyme gegenüber der ersten Phase deutlich erhöht, erreichte aber nicht die Werte der normalen Zelle.
4. In der dritten Phase (bis zum 127. Tag = 144 mg DÄNA) erfolgte läppchenzentral die Umwandlung

der Leberzellen in Krebszellen. Die Umwandlung begann mit dem Auftreten kleiner basophiler Zellgruppen, die sich in der Folgezeit vergrößerten und schließlich zu makroskopisch sichtbaren Carcinomen wurden. Histochemisch wiesen diese Zellen eine erhebliche Vermehrung der DNS und RNS auf, während das Glykogen fehlte; auch die Aktivität der untersuchten Enzyme war extrem herabgesetzt.

5. In der Folgezeit entstanden aus den primären Carcinomknoten trabekuläre, tubulo-alveoläre und anaplastische Carcinome. Die Enzymaktivität war bei den tubulo-alveolären Carcinomen, die den höchsten Differenzierungsgrad aufwiesen, am geringsten vermindert. Beim weniger differenzierten trabekulären Carcinom war auch die Enzymaktivität deutlicher herabgesetzt; noch geringer war sie beim anaplastischen Carcinom.
6. Unsere Untersuchungsergebnisse unterstützen die Hypothese Büchners, daß sich das Carcinom infolge einer fortwährenden Cytoplasmaschädigung entwickelt, die zunächst zu einer Leistungssteigerung des Kerns mit erhöhter RNS- und Eiweißsynthese führt, dann aber infolge Entkoppelung der RNS-Protein-Synthese und der DNS-Synthese zum Carcinom führt.
 - a. Der weitgehende Glykogenschwund und die starke Herabsetzung der Enzymaktivität während der grobblasigen Umwandlung ist Ausdruck einer schweren Cytoplasmaschädigung.
 - b. Die Steigerung des Eiweiß-, RNS- und Glykogen-Gehaltes sowie die Erhöhung der Enzymaktivität

während der feinblasigen und der homogenisierenden Zellumwandlung entspricht einer weitgehenden Kompensation der Cytoplasmaschädigung.

- c. Der völlige Glykogenverlust der basophilen Zellen, - der primären Carcinomzellen, - sowie der extreme Schwund aller Enzymaktivitäten korreliert mit einer mangelhaften Bildung zellspezifischer Proteine infolge einer starken Erhöhung der Mitoserate.
- d. Die unterschiedliche Differenzierung der endgültigen Carcinome und die dementsprechende unterschiedliche Enzymaktivität weist am ehesten darauf hin, daß im Carcinom die intrazelluläre Rückkoppelung nicht völlig aufgehoben ist, sondern sich auf einem je nach Differenzierungsgrad der Krebszellen unterschiedlich tiefen Niveau wieder einstellt.

Literaturverzeichnis

Altmann, H.W.:

Allgemeine morphologische Pathologie des Cytoplasmas.
In: Hdb. allg. Path., Bd. II/1, S. 418-612. Springer
Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1965.

--- : Berl. Med. 8, 413-420 (1957) zitiert nach Grundmann
und Sieburg (1962).

Barka, T., and Anderson, P.S.:

Histochemistry. Theory, Practice and Bibliography.
Hoeber Medical Division, Harper & Row, Publishers,
Inc. New York, Evanston, and London 1963.

Barnes, J.M., and Magee, P.N.:

Some toxic properties of Dimethylnitrosamine.
Brit. J. industr. med. 11, 167-174 (1954).

Büchner, F.:

Die Pathologie der cellulären und geweblichen Oxyda-
tionen. Die Hypoxydasen. In: Hbd. allg. Path., Bd.
IV/2, S. 569-668. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-
Heidelberg 1957.

--- : Allgemeine Pathologie. 5. Aufl. Urban u. Schwarzen-
berg, München-Berlin-Wien 1966.

Druckrey, H., Preussmann, R. und Schmähel, D.:

Carcinogenicity and chemical structure of nitrosamines.
Acta U. Int. Cancer 19, 510-512 (1963).

Druckrey, H., Schildbach, A., Schmähel, D., Preussmann, R.
und Ivankovic, S.:

Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von
Diäthylnitrosamin.
Arzneimittel-Forsch. 13, 841-851 (1963).

Dunn, W.L.:

Ethionine carcinogenesis in the rat.
J. Path. Bact. 89, 513-524 (1965).

Elizabeth und James Miller:

Die Biochemie der Krebsentstehung in der Leber. Grenzen des Wissens: Eine Schriftenreihe zur Förderung von Forschung und Erkenntnis. Herausgegeben von H.J. Feuerborn. Unger u. Domröse Verlag, Berlin-Herne 1952.

Gedigk, P. und Totović, V.:

Histochemische Methoden. In : Biochemisches Taschenbuch. Herausgegeben von H.M. Rauen Bd. II, S. 437-494. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York. 2. Aufl. 1964.

Gössner, W., und Friedrich-Frekxa, H.:

Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine.
Z. Naturforsch. 19 b, 862 (1964).

Grundmann, E. und Sieburg, H.:

Die Histogene und Cytogene des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild.
Beitr. path. Anat. 126, 57-90 (1962).

Hadjiolov, D.C.:

Histochemical studies of some oxidative enzymes in the early proliferative stage of liver cancerogenesis.
Z. Krebsforsch. 66, 473-477 (1965).

Hamperl, H.:

Die Morphologie der Tumoren. In : Hdb. allg. Path., Bd. VI/3, S. 18-106. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956.

Hecht, A., Korb, G. und David, H.:

Vergleichende histochemische, fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zur Frühdiagnose des Herzinfarktes der Ratte.
Virchows Arch. path. Anat. 334, 267-284 (1961).

Hübner, G. und Bernhard, W.:

Das submikroskopische Bild der Leberzelle nach temporärer Durchblutungssperre.

Beitr. path. Anat. 125, 1-30 (1961).

Kettler, L.-H.:

Die Leber. In Kaufmann-Stemmler: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie, Bd. II/2, S. 913-1260. Walter De Gruyter & Co., Berlin 1958.

Magee, P.N.:

Cellularinjury and alkylation of cell components. Cellular Injury. Ciba foundation symposium. J. & A. Churchill, Ltd., 1964.

Magee, P.N., and Barnes, J.M.:

The production of malignant hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine.

Brit. J. Cancer 10, 114-122 (1956).

Mölberr, E.:

Das elektronenmikroskopische Bild der Leberparenchymzelle nach histotoxischer Hypoxydose.

Beitr. path. Anat. 118, 203-227 (1957).

Mölberr, E., Hill, K. und Büchner, F.:

Die Kanzerisierung der Leberparenchymzelle durch Diäthylnitrosamin im elektronenmikroskopischen Bild.

Beitr. path. Anat. 126, 218-242 (1962).

Nickel, E. und Diener, E.:

Die oxydative Phosphorylierung isolierter Rattenlebermitochondrien während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin.

Beitr. path. Anat. 132, 429-440 (1965).

Oehlert, W., Coté, J. und Büchner, F.:

Autoradiographische Untersuchungen zur Cancerisierung der Epidermiszelle der Mäusehaut nach Methylcholanthrenpinselung.

Beitr. path. Anat. 125, 280-303 (1961).

Pearse, A.G.E.:

Histochemistry; Theoretical and Applied. J. & A.
Churchill, Ltd., London 1961.

Schmähl, D., Preussmann, R. und Hamperl, H.:

Leberkrebs erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin
nach oraler Gabe bei Ratten.

Naturwissenschaften 47, 89 (1960).

Thomas, C.:

Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeug-
ten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte.

Z. Krebsforsch. 64, 224-233 (1961).

Thomas, C. und Schmähl, D.:

Vergleichende morphologische und toxikologische
Untersuchungen an Maus, Ratte, Meerschweinchen
und Organotropie des Diäthylnitrosamins.

Virchows Arch. path. Anat. 340, 122-136 (1965).

Wachstein, M.:

Enzyme. In : Handbuch der Histochemie. Herausgegeben
von W. Graumann und K. Neumann, Bd. VII/2, S. 73-
153. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1962.

Tab. 1 Histochemische Methoden

Nachgewiesene Substanzen bzw. Enzymaktivitäten	Herstellung und Vorbehandlung der Schnitte	Methode	Literatur
Neutralfett	KS	Sudan III u. IV nach Kay und Whitehead (1941)	Gedigk und Totović (1964)
Glykogen	KS + 5 Min. abs. Alk., (Kontrollschnitt mit Diastase- Vorbehandlung)	Perjodsäure- Schiff-Reaktion (PAS)nach Hotchiss (1948)	Gedigk und Totović (1964)
Glykoproteide und Mucopoly- saccharide	KS + 5 Min. abs. Alk., Diastase- Vorbehandlung	Perjodsäure- Schiff-Reaktion (PAS)nach Hotckiss (1948)	Gedigk und Totović (1964)
Nukleinsäuren			
DNS	KS + 10 Min. in CL	nach Feulgen u. Rosenbach (1924)	Gedigk und Totović (1964)
DNS u. RNS	KS + 10 Min. in CL	Methylgrün-Pyro- nin Y, nach Kurnick (1955)	Gedigk und Totović (1964)
DNS u. RNS	KS	Acridinorange (p_H 6,8) nach Schümmel- feder (1950) (mod.)	Hecht, Korb und David (1961)

Tab. 1 Histochemische Methoden (Fortsetzung)

Nachgewiesene Substanzen bzw. Enzymaktivitäten	Herstellung und Vorbehandlung der Schnitte	Methode	Literatur
=====			
Saure Hydrolasen (Lysosomale Enzyme)			
Saure Phosphatase	KS + 10 Min. in FCL	Bleisalz nach Gomori (1941)(mod.)	Barka und Anderson (1963)
β -Glukoronidase	KS	Azofarbstoff nach Seligman u. Mitarb. (1954)	Barka und Anderson (1963)
Esterase (unspezifische)	GS (FCL)	Naphthol-AS- Acetat, nach Gomori (1952)	Pearse (1961)
=====			
Cytoplasmatische und mikrosomale Enzyme			
Glucose-6- Phosphatase	KS	Bleimethode, nach Wachstein und Meisel (1956)	Barka und Anderson (1963)
Lipase	KS	Tween 80, nach Gomori (1952)	Pearse (1961)
=====			

Tab. 1 Histochemische Methoden (Fortsetzung)

Nachgewiesene Substanzen bzw. Enzymaktivitäten	Herstellung und Vorbehandlung der Schnitte	Methode	Literatur
=====			
Mitochondriale Enzyme			
Cytochrom-Oxydase	KS	N-Phenyl-p- phenyldiamin, nach Burstone (1960)	Pearse (1961)
Succinodehydro- genase	KS	Tetrazolium, nach Nachlas u. Mitarb. (1957)	Pearse (1961)
Monoamino-Oxydase	KS	Tetrazolium, nach Glenner u. Mitarb. (1957)	Barka und Anderson (1963)
Laktatdehydro- genase	KS	Tetrazolium, nach Hess, Scar- pelli u. Pearse (1958)	Pearse (1961)
Glycerophosphat- dehydrogenase	KS	Tetrazolium, nach Hess, Scar- pelli u. Pearse (1958)	Pearse (1961)
Glucose-6-phosphat- dehydrogenase	KS	Tetrazolium, nach Nachlas u. Mitarb. (1958) (mod.)	Barka und Anderson (1963)
Isocitratdehydro- genase	KS	Tetrazolium, nach Nachlas u. Mitarb. (1958) (mod.)	Barka und Anderson (1963)
DPNH- und TPNH- Diaphorasen	KS	Tetrazolium, nach Scarpelli u. Mitarb. (1958) (mod.)	Barka und Anderson (1963)
=====			

Erläuterungen:

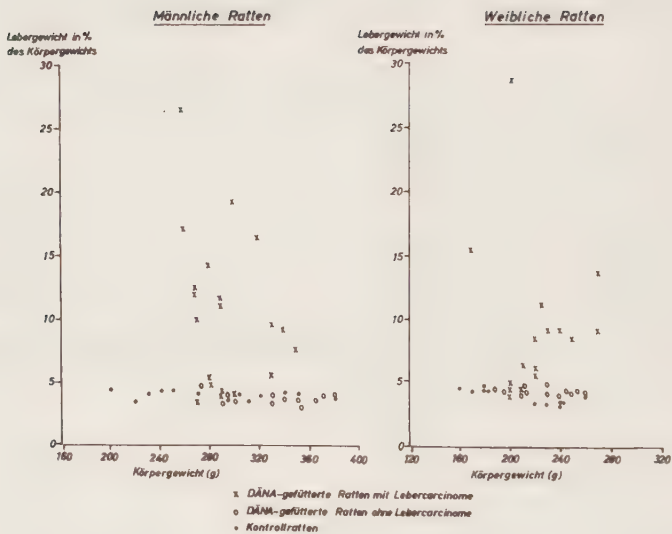
CL = Carnoysche Lösung
GS = Gefriermikrotomschnitt

FCL = kalte Formalin-Calcium-Lösung
KS = Kryostatschnitt

Tage	ohne Lebercarcinom																				mit Lebercarcinom																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													

x getötete Ratten (49)
 s spontan verendete Ratten (26)
 s' spontan verendete Ratte
 mit einem Leiomysarkom (1)

Tab. 2 Aufschlüsselung der getöteten und verendeten
 Tiere nach dem Zeitpunkt des Todes und dem Carcinom-
 befall während der Cancerisierung mit DANA.



Tab. 3 Verhältnis zwischen Leber- und Gesamtgewicht der Ratten während der Cancerisierung mit DANA.

Nachgewiesene Substanzen	Normale Leberzellen	Grobblasige Zellen	Feinblasige Zellen	Eosinophile Zellen	Basophile Zellen	Lebercarcinom		
						Trabekulär	Tubuloalveolär	Anaplastisch
RNS	+++	- / ±	+ / ++	++++	++++	+++ +++	+++ +++	++++
DNS	+++	+ / ++	+ / ++	++++	++++	++++	++++	+++
Glykogen	+++	- / ±	± / +	+ / ++	- / ±	- / ± *	-	-
Fett	-	-	-	-	-	- / ± **	-	-

* 2 von 36 Fällen positiv
** 23 von 36 Fällen positiv

Tab. 4 RNS-, DNS-, Glykogen- und Fettgehalt der Leberzelle während der Cancerisierung sowie der manifesten hepatocellulären Carcinome.

- negativ; ± uneinheitlich; + schwach;
++ deutlich; +++ stark; ++++ sehr stark.

Tab. 5 Enzymhistochemisches Verhalten der Leberzellen
während der Cancerisierung mit DÄNA.

Abkürzungen:

SP = Saure Phosphatase

E = Esterase (unspezifische)

β -GN = β -Glukuronidase

CyOx = Cytochrom-Oxydase

SDH = Succinodehydrogenase

MAO = Monoamino-Oxydase

LDH = Laktatdehydrogenase

DPNH- u. TPNH-D = DPNH- u. TPNH-Diaphorasen

IDH = Isocitratdehydrogenase

G6P-DH = Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

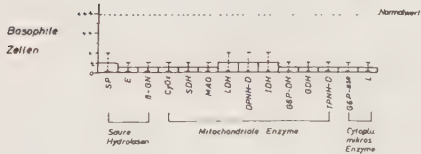
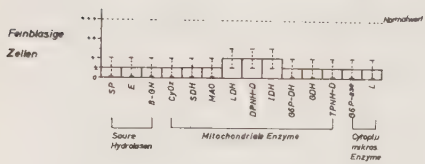
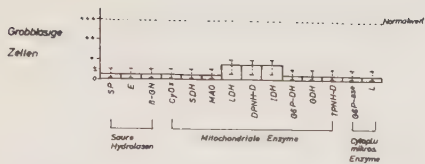
GDH = Glycerophosphatdehydrogenase

G6P-ase = Glucose-6-Phosphatase

L = Lipase

- negativ; $\pm$ uneinheitlich; + schwach;

++ deutlich; +++ stark; ++++ sehr stark.



Tab. 6 Enzymhistochemisches Verhalten der verschiedenen Wachstumsformen des hepatocellulären Carcinoms.

Abkürzungen:

SP = Saure Phosphatase

E = Esterase (unspezifische)

β -GN = β -Glukuronidase

CyOx = Cytochrom-Oxydase

SDH = Succinodehydrogenase

MAO = Monoamino-Oxydase

LDH = Laktatdehydrogenase

DPNH- u. TPNH-D = DPNH- u. TPNH-Diaphorasen

IDH = Isocitratdehydrogenase

G6P-DH = Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

GDH = Glycerophosphatdehydrogenase

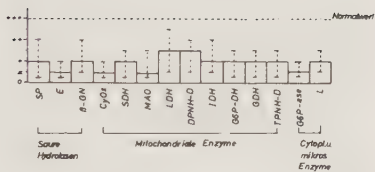
G6P-ase = Glucose-6-Phosphatase

L = Lipase

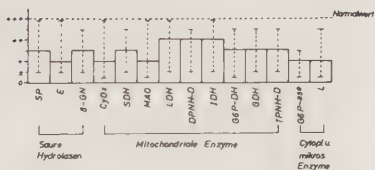
- negativ; $\pm$ uneinheitlich; + schwach;

++ deutlich; +++ stark; ++++ sehr stark.

Trabekuläres
Carcinom



Tubulo-alveoläres
Carcinom



Anaplastisches
Carcinom

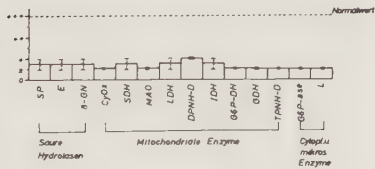


Abb. 1 Zellveränderungen der Leber vor dem Auftreten
von Carcinomen (HE, 600-fach)

- a) Grobblasig umgewandelte Leberzellen
- b) Feinblasig umgewandelte Leberzellen
- c) Homogen-eosinophil umgewandelte Leberzellen

a)

b)

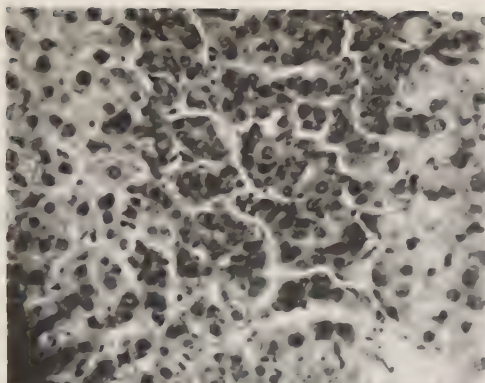
c)



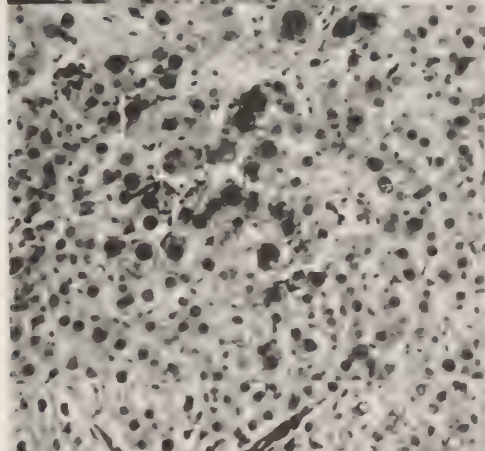
Abb. 2 Krebsige Umwandlung der Leberzellen (HE, 600-fach)

- a) Kleine basophile Zellen
- b) Große basophile Zellen
- c) Mikrocarcinom

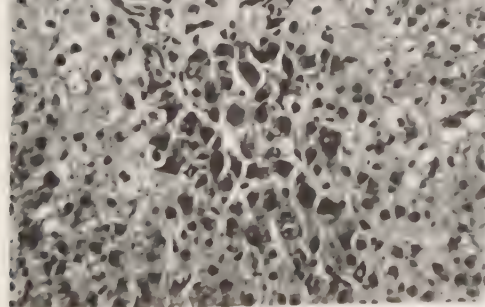
a)



b)



c)



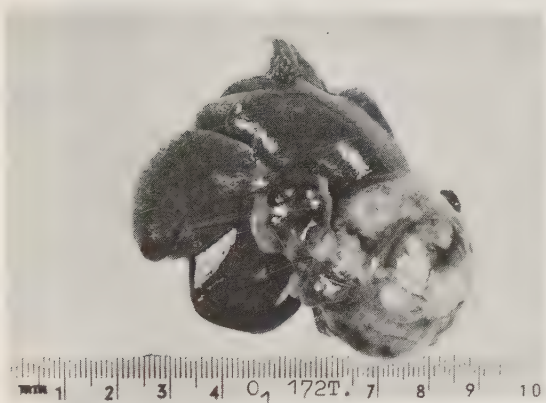
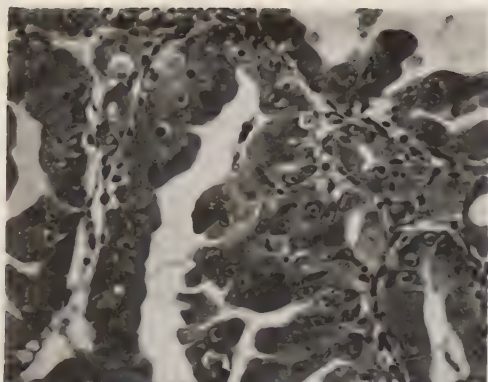


Abb. 3 Von mehreren Krebsknoten durchsetzte Leber

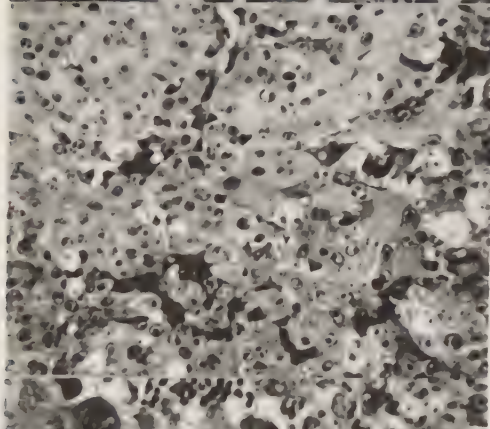
Abb. 4 Verschiedene Wachstumsformen des hepatocellulären Carcinoms (HE, 600-fach)

- a) Tubulo-alveoläre Wachstumsform
- b) Trabekuläre Wachstumsform
- c) Anaplastische Wachstumsform

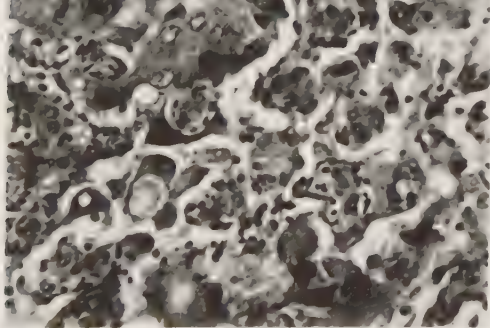
a)



b)



c)



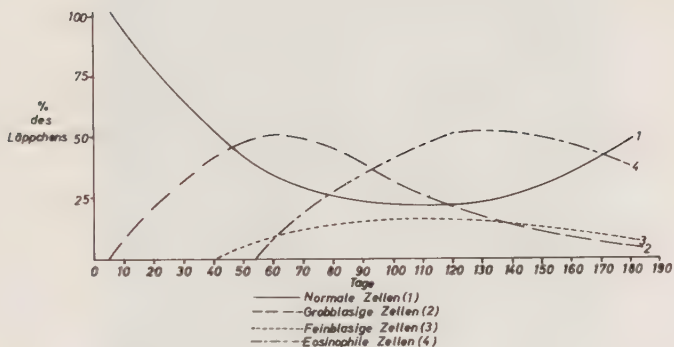


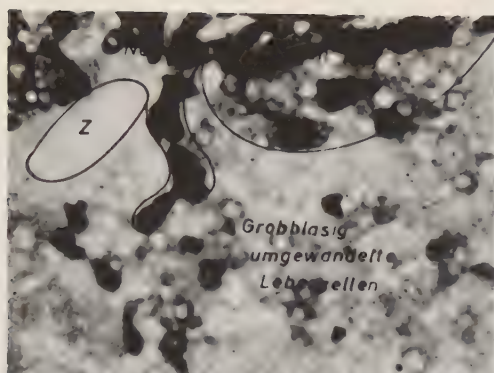
Abb. 5 Veränderungen in der Zellzusammensetzung der Leberläppchen während der Cancerisierung. (Die basophilen Zellen = primäre Carcinomnester sowie die manifesten Carcinome wurden nicht berücksichtigt.)

Abb. 6 Glucose-6-Phosphatase-Aktivität der Leberzellen während der Cancerisierung (600-fach)

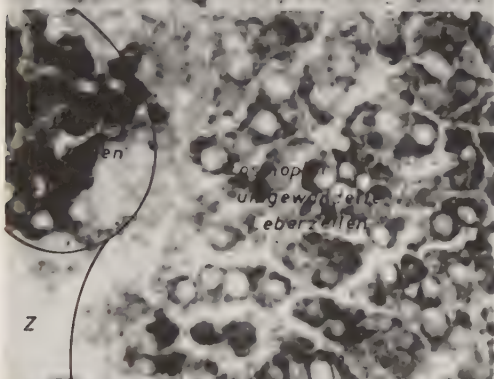
- a) Grobblasige Zellen
- b) Eosinophile Zellen
- c) Basophile Zellen

Z = Zentralvene

a)



b)



c)

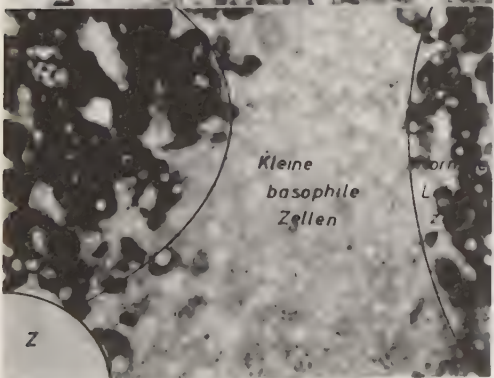
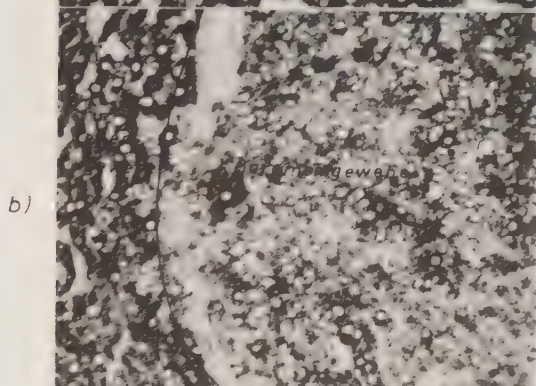
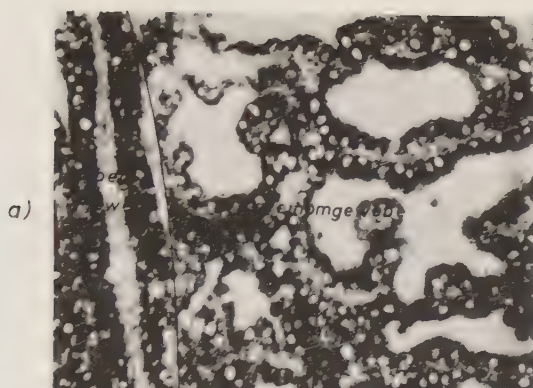


Abb. 7 Aktivität der Lactatdehydrogenase bei den verschiedenen Wachstumsformen des hepatocellulären Carcinoms (240-fach)

- a) Tubulo-alveoläre Wachstumsform
- b) Trabekuläre Wachstumsform
- c) Anaplastische Wachstumsform



Herrn Professor Dr. med. P. Gedigk danke ich
lich für die mir gewährte Aufnahme in seinem
tut, für die Überlassung des Themas und für a
die er mir bei der vorliegenden Arbeit zuteil
ließ.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Do
Dr. med. P. Schmitz-Moormann, Herrn Professor
G. Vawter und Herrn Dr. med. A. Krug, die mir
lich und persönlich unermüdlich zur Seite sta

Lebenslauf

Als thailändischer Staatsangehöriger und Buddhist wurde ich am 2. März 1932 als drittes Kind des Regierungsbeamten a.D. Anek Dharamadhach und seiner Ehefrau Chavalit, geb. Malakul in Prachinburi/Thailand geboren.

1951 legte ich nach 12-jährigem Besuch der Volks- und Oberschule in Ubolrajdhani, Surasdhani und Bangkok das Abitur ab.

Unmittelbar danach begann ich das vormedizinische Studium an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Chulalongkorn-Universität in Bangkok. Nach Absolvierung des vormedizinischen Kurses setzte ich mein Studium am Siriraj-Krankenhaus der Medizinischen Fakultät fort.

1957 unterzog ich mich erfolgreich der medizinischen Schlußprüfung und erhielt den akademischen Grad "Medicinae Baccalaureus" (M.B.).

Nach einjähriger Tätigkeit als "house officer" am Siriraj-Krankenhaus arbeitete ich von 1958 bis 1961 als "instructor" in der Pathologischen Abteilung desselben Krankenhauses. Während dieser Zeit führte ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. P. Tansurat Untersuchungen über die Schistosomiasis und die interstitielle, plasmazelluläre Pneumonie durch.

1961 kam ich erstmals als Humboldt-Stipendiat nach Deutschland und war nach dem Besuch des Goethe-Instituts bei Herrn Prof. Dr. med. P. Gedigk am Pathologischen Institut der Universität Marburg tätig. Ende März 1962 mußte ich wegen Erkrankung meines Vaters nach Thailand zurückkehren. Dort arbeitete ich wieder am Siriraj-Krankenhaus und führte Untersuchungen an einem extramedullären Plasmozytom der Lunge und an mehreren Fällen von Salmonellen-Meningitis durch.

Im September 1964 kam ich erneut nach Deutschland und nahm meine Tätigkeit am Pathologischen Institut der Universität Marburg wieder auf. Seit dieser Zeit beschäftige ich mich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. P. Gedigk und Herrn Priv.-Doc. Dr. med. Schmitt-Moormann mit experimentellen Untersuchungen über die Cancerisierung und zusammen mit Herrn Dr. med. A. Krug mit Untersuchungen über den experimentellen Herzinfarkt.

Meine akademischen Lehrer an der Siriraj Hospital
Medical School der University of Medical Sciences
of Bangkok waren die Herren Professoren und Dozenten:

Balangkura, O., Balangkura, P., Bhatdrekorn, Bidyabhed,
Boonnak, Borirakvejakarn, Chatikvanich, Garnjana-Goonchorn,
Harinasuta, Ch., Harinasuta, T., Juengjaroen, D.,
Juengjaroen, U., Julpan, Kangsadal, Ketusinh, Koonvisal,
Na-Bangchang, Na-Nakorn, Netsiri, A., Netsiri, Ch.,
Niyomsen, Osathanondh, Pacharee, Porapakkam, Poshakrishna,
Sakulthai, Sangvichien, Smerasuta, Sriben, Stitnimankarn,
Sukanhaketu, Sukavajana, Suwannik, Tansurat, Tapwongs,
Tuchinda, Unangkul, Utayanang, Vajanondh, Viranuvati.

Publikationen

1. Zusammen mit Chaiyaporn, V. und Koonvisal, L.:
The first case of Schistosomiasis japonica in Thailand.
J. Med. Ass. Thail. 42, 438 (1959).
2. Zusammen mit Sarobol, S.:
Pneumocystis carinii pneumonia in Thailand, the first
reported case.
J. Med. Ass. Thail. 44, 309 (1961).
3. Zusammen mit Pacharee, P. und Viseskul, Ch.:
Salmonella meningitis.
J. Med. Ass. Thail. 47, 589 (1964).
4. Zusammen mit Pacharee, P. und Chatikvanich, K.:
Extramedullary plasmacytoma of the lung.
J. Lancet 85, 163 (1965).
5. Zusammen mit Krug, A. und Krug, Ch.:
Zur Spezifität des histochemisch negativen
Phosphorylasenachweis.
Histochemie (im Druck).

